(مقاله پژوهشی)

مقایسه ترکیبات عمده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه هفت‌بند ژاپنی *Polygonum cuspidatum*) با ریشه هفت‌بند افغانی*Polygonum afghanicum*)

اسماعیل رضائی‌سرشت[۱]، بهنام مهدوی[۱*]، منیره پرندوارمنش[۱]، حسن رضائی‌سرشت[۲]، احمدرضا اولیایی[۳]

۱- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران.

۲- مرکز تحقیقات طب سنتی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران.

۳-گروه شیمی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۱ تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۰۹/۰۹

چکیده

گونه‌های هفت‌بند که متعلق به خانواده پلی‌گوناسه*Polygonaceae*) هستند، استفاده‌های متنوعی در طب سنتی کشورهای آسیایی مانند چین، ژاپن و ایران دارند. در این مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره های متانولی ریشه گونه هفت‌بند افغانی(*Polygonum afghanicum*) جمع آوری شده در بهار و پاییز، و عصاره متانولی ریشه هفت‌بند ژاپنی (*Polygonum cuspidatum*) اندازه گیری و با یکدیگر مورد مقایسه شدند. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با استفاده از آزمون های مختلف آنتی اکسیدانی، از جمله اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فنولیTPC و فلاونوئیدیTFC، فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد RSA، کلات کردن یون آهن FIC و آزمون بی رنگ شدن بتا-کاروتن BCB انجام شد.بیشترین مقادیر محتوای کل ترکیبات فنولی ۳۴۷/۲±۳/۱mgGAE/g و فلاونوئیدی ۱۶۵/۲±۱/۶mgRE/g برای گیاه هفت بند ژاپنی به دست‌آمد؛ در حالی کهگیاه هفت بندی افغانی جمع آوری شده در فصل بهار با اندکی تفاوت بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی درآزمون های RSA با مقادیر IC_{50}=۱۴/۵±۱/۵µg/mL،FIC به میزان ۹۶/۷±۱/۷٪و BCB به مقدار ۵۰/۹±۳/۶٪ از خود نشان داد.با توجه به نتایج فوق، گونه هفت بند افغانی جمع آوری شده در فصل بهار به عنوان گونه ای بومی توانایی بیشتری در برخی از آزمون های‌آنتی اکسیدانی از خود نشان داد. این نتایج می تواند به دلیل وجود ترکیبات موثره دیگر در این گونه باشد.

واژه های کلیدی: هفت‌بند ژاپنی، هفت‌بند افغانی،آزمون TPC، آزمون RSA، آزمون FIC.

*مسئول مکاتبات: b.mahdavi@hsu.ac.ir

۱-مقدمه

داروهای گیاهی نقش حیاتی در حفظ سلامت انسان ها ایفا می کنند، به طوری که اکثریت جمعیت جهان از داروهای گیاهی استفاده می کنند. گزارشی از سازمان بهداشت جهانی نشان می دهد که ۲۱۰۰۰ گیاه تاکنون برای مقاصد درمانی مورد استفاده قرار گرفته اند(۱). قدرت درمانی برخی از گیاهان به طورعمده ناشی از وجود برخی ترکیبات ثانویه است که در مجموع ترکیبات گیاهی نامیده می شوند (۱۴). در حال حاضر، یافته ها نشان می دهند که رادیکال های آزاد در بیماری‌زایی بسیاری از بیماری ها دخیل هستند. با افزایش گونه های اکسیژن رادیکالی یا فعال، سیستم دفاعی بدن نیاز به آنتی اکسیدان هایی خارج از بدن انسان دارد. ترکیبات آنتی اکسیدانی سنتزی به علت اثرات جانبی، کمتر مورد توجه هستند.از این رو، تمایل به استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی با منشا گیاهی افزایش یافته است (۱۵). گیاه هفت‌بند ژاپنی *Polygonum cuspidatum* عضوی از جنس هفت بند در خانواده پلی گوناسه است که در آسیا و آمریکای شمالی می روید.گیاه هفت‌بند ژاپنی اثرات سودمند بالقوه ای مانند فعالیت های ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد التهاب، استروژنی، محافظت کننده کبدی، محافظت کننده عصبی و محافظت‌کننده قلبی دارد(۲۲). هفت‌بند ژاپنی دارای انواع گوناگونی از مواد شیمیایی است؛ استیلبن هایی شامل رسوراترول، پلی داتین، و آنتراکینون هایی نظیر امودین و گلیکوزیدش، ترکیبات عمده موجود در هفت‌بند ژاپنی هستند (۲۰).رسوراترول[1] و پلی داتین[2]،به دلیل خواص دارویی نظیر فعالیت های ضد سرطانی(۲)و محافظت کننده قلبی (۷)، به طورگسترده ای در فرآورده های بهداشتی و صنایع آرایشی، استفاده می شوند. همچنین، امودین دارای خواص ضد باکتری (۴) و ضد تومور (۱۸) می باشد. هرچند تا به حال مطالعات زیادی بر روی گیاه هفت‌بند ژاپنی صورت گرفته است، اما تاکنون هیچ بررسی به منظور شناسایی ترکیبات موثره موجود در هفت‌بند افغانی گزارش نشده است. همچنین تاکنون هیچ آزمایشی برای تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه هفت‌بند افغانی صورت نگرفته است. از آن جایی که ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی جزء مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها به شمار می‌روند؛ لذا در این مطالعه محاسبه مقدار کل فنل‌ها و فلاونوئیدها به‌منظور درک بهتر مکانیسم آنتی‌اکسیدانی آن ها، انجام شده است. ضمنا، فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های دو گونه گیاه هفت‌بند مذکور تعیین و مقایسه گردیده است.

۲- مواد و روشها

۲-۱-معرف ها و دستگاه ها

دستگاه اسپکتروفتومتر(UV/Vis UNICAM8620)، معرف فولین سیوکالتیو و لینولئیک اسید از فلوکا؛ گالیک اسید و کوئرستین از آکروس؛ ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، رسوراترول، پلی‌داتین، معرف Ferrozine، بتا-کاروتن، روتین، توین ۴۰[3] و هیدروکسی تولوئن بوتیل دارشده (BHT) از شرکت سیگما خریداری شدند.

۲-۲-مراحل آماده سازی گیاه

گیاه هفت‌بند افغانی از ارتفاعات ۱۶۰۰متری کوه‌های طبس واقع در شمال سبزوار در اردیبهشت و مهر ماه جمع‌آوری شد. گیاه مورد نظر در هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد با کد هرباریومی ۴۲۸۶۲ شناسایی شد. سپس گیاه در سایه خشک، ریشه ی آن جدا و آسیاب شد. ریشه ی خشک شده گیاه هفت بند ژاپنی نیز به صورت تجاری از ژاپن خریداری و آسیاب گردید.

۲-۳-عصاره‌گیری

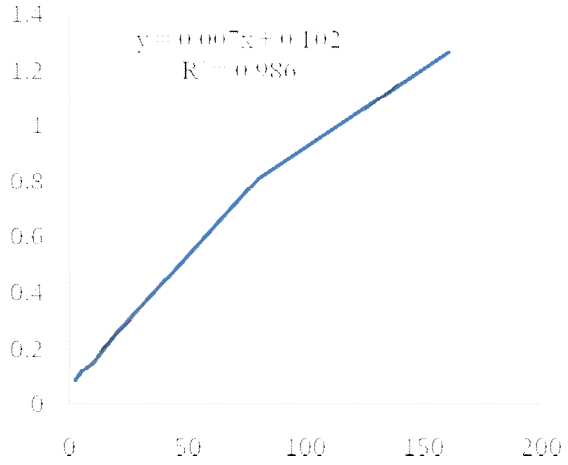
به منظور تهیه عصاره با استفاده از روش خیساندن، و مطابق روش گزارش شده توسط مهدوی وهمکاران با کمی تغییرات

1-Resveratrol
2-Polydatin
3-Tween

انجام گرفت(۱۰). در ابتدا۱۰۰ گرم از ریشه‌های خشک آسیاب شده هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در فصل بهار، پائیز و هفت‌بند ژاپنی)در متانول به مدت ۴۸ ساعت خیسانده و عصاره متانولی حاصل با صاف کردن جدا شد. این کار سه مرتبه تکرار گردید. سپس عصاره توسط دستگاه تقطیرکننده دوار روتاری) تحت خلاء در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. در انتها عصاره های تغلیظ شدهجمع آوری و برای انجام آزمون ها در فریزر°C ۲۰-نگهداری شدند.

۲-٤-اندازه‌گیری محتوای فنلی کل (TPC)

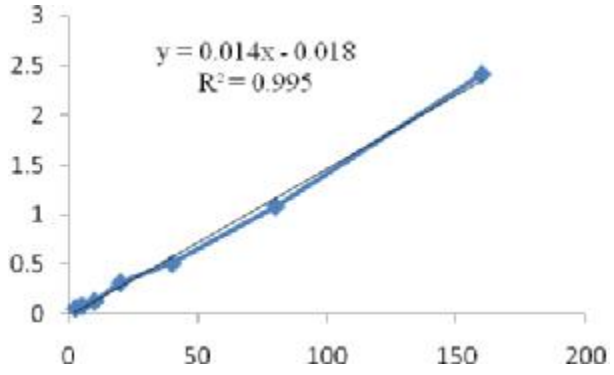
در این آزمون، محتوای کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌های متانولی ریشه های سه گیاه برحسب میلی‌گرم گالیک اسید هم‌ارز میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک (mgGAE/g)، مطابق با روش ارائه شده توسط مهدوی و همکاران محاسبه گردید(۱۰).در ابتدا، محلولی با غلظت ۱۰۰µg/mLاز عصاره تغلیظ شده در متانول تهیه شد. سپس به مقدار ۰/۵ mL از این محلول، ۱/۵mL آب مقطر و۰/۵ mL محلول ۱۰% فولین سیوکالتیو (FCR) افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه،۲mL سدیم‌کربنات آبی ۱۰% به محلول اضافه گردید. پس از گذشت ۲ ساعت از قراردادن نمونه در تاریکی ودمای اتاق، میزان جذب در طول موج ۷۶۰nm اندازه گیری شد. آزمایش مذکور ۳ بار تکرار گردید.برای تعیین میزان ترکیبات فنلی در نمونه، از منحنی استاندارد اسیدگالیک شکل (۱) با غلظت‌های مختلف ۱۶۰µg/mL-۲/۵) که در شرایط یکسان با نمونه‌های گیاهی به دست آمد، استفاده گردید.



شکل۱-. نمودار استاندارد جذب بر حسب غلظت گالیک اسید برای تعیین محتوی فنلی کل

۲-۵-اندازه‌گیری محتوای فلاونوئیدی کل(TFC)

در این آزمونکه مطابق روش ارائه شده توسط کویتیر انجام شد (۱۳)، از روتین به عنوان یک ترکیب استاندارد استفاده گردید. ابتدا۱mL از محلول متانولی عصاره تغلیظ شده با غلظت ۱۰۰µg/mL را با ۱mL محلول متانولی ۲٪ $AlCl_3$ مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و سپس جذب آن در ۴۱۵ nm اندازه گیری شد. برای سنجش از نمودار استاندارد روتینبا غلظت متفاوت ۱۶۰µg/ml-۲/۵)استفاده شد شکل(۲). نتایج بر حسب هم‌ارز میلی‌گرم روتین در گرم عصاره خشک(mgRE/g) به دست آمد. همه اندازه‌گیری‌ها برای افزایش دقت با سه بار تکرار انجام شدند.



شکل۲- نمودار استاندارد جذب بر حسب غلظت روتین برای تعیین محتوی فلاونوئیدی کل

۲-۶-بررسی فعالیت های آنتی اکسیدانی

بررسی و اندازه گیری فعالیت اکسیدکنندگی گیاه هفت بند شامل سنجش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، فعالیت کلات‌کنندگی یون‌های آهن FIC و خصوصیت مهار پراکسیداسیون لیپید به روش بی رنگ شدن بتا-کاروتن(BCB) با کمی تغییر،مطابق با روش ارائه شده توسط مهدوی و همکارانانجام شد(۹).

۲-۷-آزمون سنجش مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH)

۱ mL از محلول DPPH با غلظت ۰/۱ میلی مولار به ۱/۵ mL محلول عصاره متانولی با غلظت های ۵ µg/mL، ۴، ۳۰، ۲۰، ۱۰ اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق قرار داده شد. سپس کاهش جذب در۵۱۷ nm اندازه گیری شد. برای افزایش دقت، آزمایش ۳ بار تکرار گردید. محلول کنترل منفی نیز دقیقا همانند دستور عمل ذکر شده در بالاتهیه گردید؛ با این تفاوت که به جای عصاره گیاهی تغلیظ شده، از حلال متانول استفاده شد. از گالیک اسید، روتین و۱۶۰-۲/۵µBHTg/mL) به عنوان استاندارد جهت مقایسه نتایج استفاده شد. با استفاده از رابطه میزان درصد بازداری استانداردها و عصاره‌ها بدست آمد. در رابطه زیر A_Cجذب نمونه کنترل حاوی حلال و محلول DPPH و A_S جذب نمونه حاوی محلول عصاره و محلول DPPH می باشد.

$$RSA\% = (A_C - A_S)/A_C)\times 100$$

۲-۸-آزمون فعالیت کلات‌کنندگی یون‌های آهن FIC

در ابتدا از نمونه تغلیظ شده عصاره گیاهی، محلول‌هایی با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ µg/mL در متانول آماده شدند. سپس،۱mL از نمونه همراه با ۲ mL آب مقطر، ۵۰ µL $FeSO_4$ و ۱۰۰ µL معرف فروزین در ظرفی ریخته شدند و حداقل بعد از ۱۰ دقیقه، جذب آن در طول موج۵۶۲ nm اندازه‌گیری گردید. از اسید سیتریک و BHT به عنوان استاندارد جهت مقایسه نتایج استفاده شد. با استفاده از رابطه زیر، میزان درصد کلات کنندگی استانداردها و عصاره‌ها بدست آمد. در رابطه زیر A_C جذب نمونه کنترل حاوی حلال، محلول سولفات آهن و فروزین است؛ و A_Sجذب نمونه حاوی محلول عصاره ،محلول سولفات آهن و فروزین می باشد.

$$FIC\% = (A_C - A_S)/A_C)\times 100$$

۲-۹-سنجش خصوصیت مهار پراکسیداسیون لیپید به روش بی رنگ شدن بتا- کاروتن(BCB)

برای تهیه‌ی معرف، ابتدا ۵۰mL لینولئیک‌اسیدLH و ۵۰۰ µL Tween40 به ۵ mL محلول بتا-کاروتن mg/mL ۱ در کلروفرم اضافه شدند. کلروفرم توسط خلاء حذف شد. سپس۱۲۵ mL آب اکسیژنه به مخلوط اضافه و برای تشکیل یک امولسیون، به شدت تکان داده شد. برای انجام

آزمون، mL ۲ از محلول عصاره‌ی ریشه گیاه در متانولبا غلظت نهایی ۲/۴µg/mL و همچنین ۲۰۰µL از معرف بتاکاروتن- لینولئیک اسید مخلوط و جذب اولیه‌ی این محلول در زمان صفر در طول موج ۴۷۰nm اندازه‌گیری شد. محلول ها در آون با درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در هر ۴۵ دقیقه میزان جذب در همان طول موج قبلی اندازه گیری گردید تا زمان ۱۸۰ دقیقه که حداکثر میزان بی رنگ شدن حاصل گردید. نمونه‌ی کنترل حاوی متانول بعنوان جایگزین عصاره‌ی گیاهی بود. از اسید آسکوربیک و BHT به عنوان استاندارد جهت مقایسه نتایج استفاده شد. با استفاده از رابطه($BCB\ \%= A_{s180})/A_{C0})-A_{C180}))\times 100A_{s0}$) مقدار درصد بی رنگ شدن استانداردها و عصاره ها بدست آمد. در رابطه فوق(A_{s0} و (A_{c0} به ترتیب مربوط به میزان جذب نمونه حاوی عصاره ومعرف) و کنترل حاوی حلال و معرف) در زمان صفر، و (A_{s180}و (A_{c180} به ترتیب مربوط به میزان جذب نمونه و کنترل در زمان ۱۸۰ دقیقه می باشند.

۲-۱۰-آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری شامل محاسبه میانگین و انحراف استاندارد توسط نرم افزار Excel انجام شده است. ارقام ارائه شده نشان دهنده میانگین± انحراف استاندارد می باشند.

۳-نتایج

۳-۱-اندازه گیری محتوی کل ترکیبات فنولی TPC

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در ریشه گیاه هفت‌بندژاپنی ۳۴۷/۲±۳/۱ mgGAE/g، هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در بهار) ۳۰۸/۵±۵/۲ mgGAE/g و هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در پائیز) ۲۳۴/۶±۴/۵ mgGAE/g به دست آمد.با توجه به نتایج به دست آمده، ریشه گیاه هفت‌بند ژاپنی حاوی ترکیبات فنولی بیشتری در مقایسه با اندام مشابه در گیاه هفت‌بند افغانی می باشد. همچنین با توجه به نتایج به دست‌آمده ریشه گیاه هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در بهار محتوی کل ترکیبات فنولی مطلوب‌تری نسبت گیاه جمع‌آوری شده در پائیز دارد جدول(۱).

۳-۲-اندازه گیری محتوی کل ترکیبات فلاونوئیدی (TFC)

محتوی کل ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره متانولی گیاه هفت‌بند ژاپنی ۱۶۵/۲±۱/۶ mgRE/g، هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در بهار) ۵۲/۱±۲/۲ mgRE/gو هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در پائیز) ۶۷/۱±۲/۴ mgRE/g می باشد. بنابراین، عصاره هفت‌بند ژاپنی به مراتب مقدار ترکیبات فلاونوئیدی بیشتری در مقایسه با عصاره هفت‌بند افغانی دارد. همچنین با توجه به نتایج به دست‌آمده عصاره ریشه هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در پائیزمحتوی کل ترکیبات فلاونوئیدی مطلوب‌تری نسبت به عصاره گیاه جمع‌آوری شده در بهاردارد جدول(۱).

۳-۳- سنجش مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH)

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول۱، بیشترین مقدار مهارکنندگی رادیکال ها برای عصاره متانولی ریشه گیاه هفت بند افغانی بهاره با IC_{50} معادل ۱۴/۵±۱/۵ µg/mL مشاهده شده است. پس از آن، گیاه هفت بند افغانی پاییزه با IC_{50} معادل ۱۵/۸±۰/۹ µg/mL و گیاه هفت بند ژاپنی با IC_{50} معادل ۱۹/۳±۱/۳ µg/mL قرار گرفته اند. بنابراین، هر دو نوع بهاره و پاییزه گیاه هفت‌بند افغانی فعالیت مهار رادیکال آزاد بیشتری نسبت به گونه ژاپنی دارا می باشند.

جدول ۱- مقادیر محتوی کل ترکیبات فنلی(TPC)، محتوی کل ترکیبات فلاونوئیدی (TFC)و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه هفت بند ژاپنی و افغانی شامل سنجش مهار رادیکال‌های آزاد (RSA)، کلات کنندگی یون‌های آهن (FIC) و بی رنگ شدن بتا-کاروتن (BCB)

نمونه های گیاهی و استانداردها	TPC mgGAE/g	TFC mgRE/g	RSA IC_{50} µg/mL)	FIC %)	BCB %)
هفت بند ژاپنی (*PC*)	۳٤۷/۲±۳/۱*	۱٦٥/۲±۱/٦	۱۹/۳±۱/۳	۹٦/٦±۱/۲	٤٦/۷±۲/۳
هفت بندافغانی بهاره(*PA*- s)	۳۰۸/٥±٥/۲	٥۲/۱±۲/۲	۱٤/٥±۱/٥	۹٦/۷±۱/۷	٥۰/۹±۳/٦
هفت بندافغانی پاییزه(*PA*- f)	۲۳٤/٦±٤/٥	٦۷/۱±۲/٤	۱٥/۸±۰/۹	۹٦/۱±۰/۷	۳۸/٥±۱/۳
هیدروکسی تولوئن بوتیل دارشده(BHT)	–	–	۸/۲±۱/۲	۹٤/۸±۱/۱	۹۰/۸±۲/٤
گالیک اسید(GA)	–	–	٦/۳±۰/۷	–	–
روتین (Ru)	–	–	۸/٥±۰/٥	–	–
سیتریک اسید(CitA)	–	–	–	٤۸/٥±۲/۳	–
آسکوربیک اسید (AscA)	–	–	–	–	۲٥/٦±۱/٥

*مقادیر میانگین سه بار تکرار به همراه انحراف استاندارد اعداد می باشند.

در مقایسه با گزارش های قبلی بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی سایر گونه های این جنس می توان گفت که عصاره های هر دو گیاه هفت بند افغانی و ژاپنی در میزان محتوی فنلی و به دام انداختن رادیکال ها فعالیت بیشتری از خود نشان داده است. برای عصاره آبی گیاههفت بند نازک *Polygonum minus*) محتوی فنلی کل مقدار mg GAE/100g ۱۶۵ و عدد ۸۲/۶٪ برای توانایی آن در به دام‌اندازی رادیکال گزارش شده است (۱۰). ریشه گیاه هفت بند اروپایی (*P. bistorta* محتوی فنلی معادل µg GAE/ g ۲۳۳۶ تا ۳۸۸۷ را ازخود نشان داد(۵). بیشترین میزان به دام اندازی رادیکال ها توسط عصاره آبی (*P. congnatum* باIC_{50} برابر با ۱۰۰mL گزارش شده است.لازم به ذکر است محتوی کل فنلی برای عصاره آبی و اتانولی این گیاه به ترتیب µg/ mL ۰/۴۸ و ۰/۵۰ هم ارز گالیک اسید در محلولی با غلظت µg/mL ۱۰ از عصاره‌ها بوده است (۲۱). در تحقیقات قبلی مشخص شده است که در تمام مراحل رشد گیاهان یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیداتیو فعال می‌باشد که شامل ترکیبات آنزیمی‌و غیرآنزیمی است. عمل این آنتی‌اکسیدان‌ها بستگی مستقیم به رشد گیاه، مرحله‌ی نمو، خصوصیت نمونه و شرایط محیطی دارد. در مراحلی که گیاهان در معرض تنش اکسایشی بالایی قرار دارند یا از نظر متابولیکی فعال‌ترند، به غلظت بالاتری از ترکیبات ثانویه نیازمند هستند (۱۷-۱۵). از آن جائی که فنول‌ها و فلاونوئیدها جزء مهمترین آنتی‌اکسیدان‌ها هستند، مقدار آن‌ها تابع عوامل ذکرشده می‌باشد. با اندازه‌گیری محتوی ترکیبات فنولی عصاره‌ها مشخص شد که در اردیبهشت ماه که فصل رویش گیاه است مقدار ترکیبات فنولی بیشتری در ریشه گیاه هفت‌بند افغانی وجود دارد که با افزایش سن گیاه این ترکیبات کاهش می‌یابند. در صورتی که محتوای ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در آبان ماه بیشتر می‌باشد. در واقع افزایش غلظت فلاونوئیدها برای افزایش دامنه‌ی تحمل گیاه به تنش های غیرزنده مانند اشعه UV از طریق کاهش آسیب به دستگاه فتوسنتزی است. بنابراین، بعد از اردیبهشت ماه گیاه در معرض مستقیم نور خورشید قرار می‌گیرد به طوری که باعث افزایش تولید ترکیبات فلاونوئیدی می‌شود. در پژوهش‌های قبلی که بر روی بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی سایر گیاه انجام شده است، ارتباط قوی بین ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است (۱۱،۱۲).در واقع ارتباط بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش به دام انداختن رادیکال آزاد DPPH و اندازه‌گیری محتوی فنل‌ها به روش فولین سیوکالتیو، به واسطه‌ی این امر است که هر دو آزمون براساس تعادل احیایی در فنول‌ها استوار می‌باشند.ترکیبات پلی‌فنولی متابولیت‌های ثانویه آروماتیک در

گیاهان به‌شمار می‌روند و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشند. بنابراین، توانایی آن ها برای مهار رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال مانند رادیکال‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل زیاد است. پتانسیل احیایی فلاونوئیدها کمتر از رادیکال‌های پروکسیل و رادیکال‌های سوپراکسید است این امر نشان می‌دهد که فلاونوئیدها می‌توانند گونه‌های اکسید را غیر فعال کنند و مانع اثرات مخرب واکنش‌هایشان شوند (۱۶).با وجود این‌که عصاره گیاهی هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در بهار، دارای مقدار فنول کمتری نسبت به گیاه هفت‌بند ژاپنی و مقدار فلاونوئید کمتری نسبت به عصاره هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در فصل پائیز و هفت‌بندژاپنی می‌باشد، اما در سنجش DPPH انجام گرفته، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری بوده است. این امر می‌تواند اینگونه استنباط شود با توجه به این‌که در مقالات زیادی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را مربوط به محتوی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی دانستند و از آن‌جایی که محتوی کل ترکیبات فلاونوئیدی در این عصاره نسبت به دیگر عصاره‌ها کمتر می‌باشد؛ وجود ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا در این عصاره پیش‌بینی می‌شود.البته این ترکیب می‌تواند در نمونه جمع‌آوری شده در پائیز هم وجود داشته باشند. اما با توجه داده‌های بدست آمده، به مقدار کمتری وجود دارند.

۳-٤-آزمون فعالیت کلات کنندگی یون‌های آهن FIC

مقادیر مربوط به کلات کنندگی یون های آهن گونه های ژاپنی و افغانی گیاه هفت بند ژاپنی که ارائه شده در جدول ۱، مربوط به غلظت ۲۰۰µg/mL می‌باشند. درصد کلات کنندگی در این غلظت برای عصاره هفت‌بند ژاپنی ۹۶/۶±۱/۲، عصاره هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در بهار۹۶/۷±۱/۷ و عصاره هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در پائیز ۹۶/۱±۰/۷ می‌باشند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، درصد بازداری هر۳ نمونه‌ی عصاره‌ی گیاهی بسیارقابل توجه و همچنین بسیار نزدیک به‌هم می‌باشند. در مقایسه با استاندارد های استفاده شده، درصد کلات کنندگی این نمونه های گیاهی به میزان قابل توجهی از اسید سیتریک۴۸/۵±۲/۳ بیشتر و با BHT که درصد کلات کنندگی برابر با ۹۴/۸±۱/۱ از خود نشان داد، قابل رقابت است. یون‌های فلزی نقش مهمی‌در سرعت بخشیدن به اکسیداسیون مولکول‌های مهم زیستی ایفا می‌کنند. به عبارت دیگر آن‌ها ابتدا تشکیل تعداد کمی رادیکال را کاتالیز می‌کنند. که منجر به انتشار واکنش زنجیری رادیکالی در پروکسیداسیون لیپید می‌شود(۶). این نشان می‌دهد که خصوصیت کلات کنندگی عصاره‌ها بر روی یون‌های Fe^{2+} ممکن است باعث محافظت بر علیه تخریب اکسیداتیو شود. گزارش شده‌است که عوامل کلات‌کننده که پیوندی دوگانه با فلز تشکیل می‌دهند، به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه موثر هستند؛ زیرا آن‌ها پتانسیل اکسیداسیون را به‌واسطه پایداری شکل اکسیدشده یون فلز کاهش می‌دهند. عوامل کلات کننده از وکنش‌های زنجیری اکسیداتیو رادیکالی در سیستم‌های غذایی یا بیولوژیکی جلوگیری می‌کنند. همچنین، ترکیبات فنولی گیاهی کلات کننده‌های یون فلزی خوبی هستند(۲۲). روش FIC فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها را براساس توانایی احیاکنندگی آهن می‌سنجد و در حقیقت خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات محلول در آب را تخمین می‌زند. در اینجا با انجام آزمون FIC مشخص شد که هر ۳ عصاره گیاهی میزان کلات کنندگی یون‌های آهن Fe^{2+}مشابهی دارند. بنابراین، ارتباطی بین محتوی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش FIC مشاهده نشد.

۳-۵-آزمون بی رنگ شدن بتا-کاروتن در امولسیون لینولئیک اسید (BCB)

مطابق نتایج جدول ۱، درصد بی رنگ شدن بتا-کاروتن در غلظت اندازه‌گیری شده برای عصاره هفت‌بند ژاپنی۲/۳±۴۶/۷، ژاپنی۲/۳±۴۶/۷، عصاره هفت‌بند افغانی جمع‌آوری شده در بهار ۳/۶±۵۰/۹ و عصاره هفت‌بند افغانیجمع‌آوری شده در پائیز)۱/۳±۳۸/۵ می‌باشد. همانگونه که مشخص است، عصاره متانولی ریشه گیاه هفت‌بند افغانی بهاره فعالیت بیشتری نسبت به دو گونه دیگر از خود نشان داده است. در مقایسه با استانداردها، میزان بی رنگ شدن بتا-کاروتن برای هر سه گونه از آسکوربیک اسید ۱/۵±۲۵/۶ بیشتر و از BHT ۲/۴±۹۰/۸ کمتر است. آزمون BCB بر پایه اندازه‌گیری فعالیت بازدارندگی از پرواکسیداسیون لیپیدها صورت می‌گیرد. اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی از طریق مهار لینوئیک‌اسید نشان داد که عصاره‌های گیاهی هفت‌بند توانایی بازدارندگی پروکسیداسیون لیپید را دارند اما ارتباط معناداری با محتوی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مشاهده نشد.

٤-نتیجه گیری

با بررسی داده‌های بدست آمده از آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی انجام گرفته، مشخص شد که گیاهان هفت‌بند ژاپنی و هفت‌بند افغانی از پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار هستند و می‌توانند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی برای مطالعات بیشتر استفاده شوند. همچنین با توجه به اینکه میزان و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در مراحل مختلف رشد متغیر می‌باشد و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه هفت‌بند افغانی در نمونه جمع‌آوری شده در بهار مشاهده شده‌است، آن می‌تواند به عنوان زمان مناسب برای برداشت گیاه به شمار آید.

۵-سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه حکیم سبزواری به خاطر پژوهانه سال ۹۵ اعلام می دارند.

٦- منابع

1. Al-Jaber, HI., Al-Qudah, MA., Barhoumi, LM., Abaza, IF., Afifi, FU. 2012. Essential oil composition of the aerial parts of fresh and air-dried Salvia palaestina Benth. Lamiaceae) growing wild in Jordan. *Natural Product Research*, 2613):1179-87.
2. . Bertelli, A., Ferrara, F., Diana, G., Fulgenzi, A., Corsi, M., Ponti, W, et al. 1998. Resveratrol, a natural stilbene in grapes and wine, enhances intraphagocytosis in human promonocytes: a co-factor in antiinflammatory and anticancer chemopreventive activity. *International journal of tissue reactions*, (214):93-104.
3. Cathrine, L., Nagarajan, NP. 2011. Preliminary phytochemical analysis and antibacterial activity of leaf extracts of Vitex leucoxylon. *LF Int J Curr Pharm Res*, (32):71-3.
4. . Chukwujekwu, J., Coombes, P., Mulholland, D., Van Staden J. 2006. Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of Cassia occidentalis. South African *Journal of Botany*, (722):295-7.
5. . Demiray, S., Pintado, M., Castro, P. 2009. Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: Tilia argentea, Crataegi folium leaves and Polygonum bistorta roots. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, (54):312-7.
6. Gordon, M. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. Food antioxidants: Springer, p. 1-18.
7. . Hung, L-M., Chen, J-K., Huang, S-S., Lee, R-S., Su, M-J. 2000. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular research*, (473):549-55.
8. Khadri, A., Serralheiro, MLM., Nogueira, JMF., Neffati, M., Smiti, S., Araújo, MEM. 2008. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from Cymbopogon

schoenanthus L. Spreng. Determination of chemical composition by GC–mass spectrometry and 13C NMR. *Food Chemistry*, (1093):630-7.

9. Mahdavi, B., Yaacob, W., Din, LB., Jahangirian, H. 2013. Antioxidant activity of consecutive extracts of the base, stem and Leaves of Etlingera brevilabrum. *Asian Journal of Chemistry*, (257):3937.
10. . Maizura, M., Aminah, A., Wan, Aida W. 2011. Total phenolic content and antioxidant activity of kesum Polygonum minus), ginger Zingiber officinale) and turmeric Curcuma longa) extract. *International Food Research Journal*. (182):529-34.
11. Mohd-Esa, N., Hern, FS., Ismail, A., Yee, CL. 2010. Antioxidant activity in different parts of roselle Hibiscus sabdariffa L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry*, (1224):1055-60.
12. Moyo, M., Ndhlala, AR., Finnie, JF., Van Staden, J. 2010. Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of Sclerocarya birrea and Harpephyllum caffrum Anacardiaceae) extracts. *Food Chemistry*, (1231):69-76.
13. Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M, et al. 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat Fagopyrum esculentum Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology*, (721):35-42.
14. . Raj, X., Chaurasia, O., Vajpayee, P., Murugan, M., Bala, S. 2010. Antioxidative activity and phytochemical investigation on a high altitude medicinal plant Dracocephalum heterophyllum Benth. *Pharmacognosy Journal*, (26):112-7.
15. Saha, M., Hasan, S., Akter, R., Hossain, M., Alam, M., Alam, M, et al. 2008. In vitro free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of Mimusops elengi Linn. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, (62):197-202.
16. Salah, N., Miller, NJ., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, GP., Riceevans, C. 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of biochemistry and biophysics*, (3222):339-46.
17. Salehi Shanjani, P., Mirza, M., Calagari, M., Adams, RP. 2010. Effects drying and harvest season on the essential oil composition from foliage and berries of Juniperus excelsa. *Industrial Crops and Products*, (322):83-7.
18. Srinivas, G., Anto, RJ., Srinivas, P., Vidhyalakshmi, S., Senan, VP., Karunagaran, D. 2003. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. *European journal of pharmacology*, (4732):117-25.
19. Van Acker, SA., Tromp, MN., Griffioen, DH., Van Bennekom, WP., Van Der Vijgh, WJ., Bast, A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. (203):331-42
20. Yi, T., Zhang, H., Cai, Z. 2007. Analysis of Rhizoma Polygoni Cuspidati by HPLC and HPLC-ESI/MS. Phytochemical Analysis, (185):387-92.
21. Yıldırım, A., Mavi, A., Kara, AA. 2003. Antioxidant and antimicrobial activities of Polygonum cognatum Meissn extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. (831):64-9.
22. Zhang, H., Li, C., Kwok, S-T., Zhang, Q-W., Chan, S-W. 2013. A review of the pharmacological effects of the dried root of Polygonum cuspidatum Hu Zhang) and its constituents. Evidence-based complementary and alternative medicine.

(Original Research Paper)

Comparison of Major Constituents and Antioxidant Activity of *Polygonum cuspidatum* Root with *Polygonum afghanicum* Root

Esmaeil Rezaei Seresh[1], Behnam Mahdavi[1*], Monireh Parandvarmanesh[1], Hassan Rezaei Seresh[2], Ahmad Reza Ovliyaei[3]

1-Department of Chemistry, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.
2-Traditional and Complementary Medicine Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.
3-Department of Chemistry, Tonkabon Branch, Islamic Azad University, Tonkabon, Iran.

Received:11/05/2019 Accepted:30/11/2019

Abstract

Polygonum species are belonging to *Polygonaceae* family and they have various uses in the traditional medicine of Asian countries such as China, Japan and Iran. In this study, antioxidant activities of two methanolic extracts of root of *Polygonum afghanicum*, one collected in spring and the other in fall, and the one methanolic extract of root of *Polygonum cuspidatum* were measured and compared with each other. So, the antioxidant activities of the extracts were evaluated using various antioxidant tests, including total phenolic content TPC), total flavonoid content TFC), radical scavenging activity RSA), ferric ion chelating FIC), and beta-carotene bleaching. The results showed the highest values of TPC 347.2 ± 3.1) and TFC 165.2 ± 1.6) for *P. cuspidatum*, while the *P. afghanicum*, collected in spring, exhibited slightly higher antioxidant activity than the others for RSA IC_{50} = 14.5 ± 1.5 µg/mL), FIC 96.7 ± 1.7%), and BCB 50.9 ± 3.6%) tests. According to the obtained results, the *P. afghanicum* collected in spring, as a local species, showed the better activity in the some of the antioxidant tests, probably due to the presence of other active metabolites in this plant.

Keywords: *Polygonum cuspidatum*, *Polygonum afghanicum*, TPC Test, RSA Test, FIC Test.

* Corresponding Author: b.mahdavi@hsu.ac.ir